

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

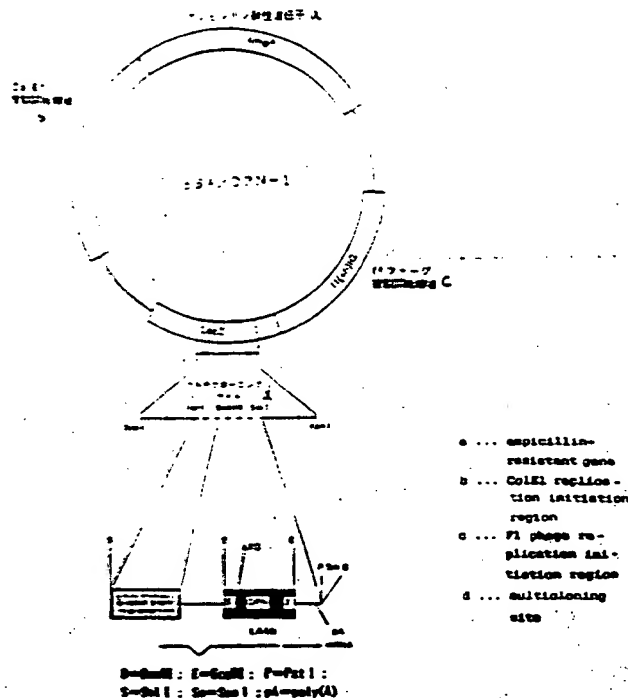
(51) 国際特許分類 A01K 67/027		AI	(11) 国際公開番号 WO97/03555
			(43) 国際公開日 1997年2月6日(06.02.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01978		(74) 代理人 弁理士 高木千嘉、外(TAKAGI, Chiyoshi et al.) 〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1996年7月16日(16.07.96)			
(30) 優先権データ 特願平7-291795 1995年7月17日(17.07.95) JP		(81) 指定国 CA, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE).	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヘキスト薬品工業株式会社 (HOECHST PHARMACEUTICALS & CHEMICALS K.K. [JP/JP]) 〒107 東京都港区赤坂2丁目17番51号 Tokyo, (JP)		添付公報書類 国際調査報告書	
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 多田昇弘(TADA, Nonhiro)[JP/JP] 〒336 埼玉県浦和市大宮大2394番地2 Saitama, (JP) 佐藤三三(SATO, Masahiro)[JP/JP] 〒259-11 神奈川県伊勢原市上粕屋246番地107号 Kanagawa, JP 池田 通(IKEDA, Toru)[JP/JP] 〒153 東京都目黒区中町2丁目48番20号305 Tokyo, (JP) 佐川穂呂(HIROKAWA, Katsuiku)[JP/JP] 〒173 東京都板橋区南町52番地の1 Tokyo, (JP)			

(54) Title: TRANSGENIC ANIMAL MODEL OF OSTEOPENIA

(54) 発明の名称: 骨減少症モデル・トランスジェニック動物

## (57) Abstract

A transgenic nonhuman vertebrate being a model of osteopenia wherein an alien gene containing a DNA sequence encoding osteopontin has been integrated into the downstream of the DNA sequence of a cytomegalovirus enhancer and the DNA sequence of chick 3-actin promoter and the excessive expression of osteopontins thus induced depresses the activities of osteoblasts and osteoclasts, thus decreasing bone mass. The transgenic animal is usable in verifying the abilities of a medicine to activate osteoblasts, to induce the differentiation of osteoclasts and to further suppress the activity thereof.



(57) 要約

サイトメガロウイルスエンハンサーのDNA配列及びニワトリベーター  
 アクチンプロモーターのDNA配列の下流に、オステオポンチン遺伝子を  
 コードするDNA配列を含む外来性遺伝子が組み込まれたことにより、オ  
 ステオポンチンが骨中で過剰に発現され骨芽細胞及び破骨細胞の活性が低  
 下して骨量の減少を生じた骨減少症モデルトランスジェニック非ヒト脊椎  
 動物。

上記トランスジェニック動物は、骨芽細胞の活性化及び破骨細胞の分化  
 誘導、活性をさらに抑制させる能力に関する薬剤の効果検定に利用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	PR	プエルトリコ
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SI	スロベニア
BB	バハマ	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GE	ジョージア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MC	モナコ	SD	スーダン
BR	ブラジル	GU	グアム	MD	モルドバ共和国	SG	シンガポール
BY	ベラルーシ	HN	ホンジュラス	MG	マダガスカル	SI	スロベニア
CA	カナダ	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
CC	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CI	コート・ジボワール	KE	ケニア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CM	カメルーン	KZ	キルギスタン	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
				NE	ニジェール	UG	ウガンダ

## 明 細 書

## 骨減少症モデルトランスジェニック動物

## 技術分野

本発明は、一般的に代謝性骨疾患の治療に関連した薬、特に破骨細胞の活性を抑えるような薬の開発に有効な骨減少症モデルトランスジェニック動物に関する。更に詳しくは、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリベーターアクチンプロモーター領域及びオステオポンチンをコードする外来性遺伝子が組み込まれた骨減少症モデルトランスジェニック動物に関する。

## 10 背景技術

骨粗鬆症は骨密度が低下する骨疾患であり、疼痛および骨折の頻度を上昇させることにより日常生活の質的低下をもたらす。現在、特に高齢化社会の到来に伴い、老人性骨粗鬆症が増加傾向になっている。

近年、骨の細胞生物学的及び分子生物学的研究が活発に展開されつつあり、近い将来に骨粗鬆症の病態解明が期待されている。また、研究の進展に伴って骨粗鬆症の治療薬あるいは診断薬の研究開発も活発に行われている。これらの薬物の生理学的及び薬効薬理学的効果を調べるためには、ヒト骨粗鬆症に類似した病態を示す適切なモデル動物の開発が非常に重要である。現在、この目的で緊用されているモデル動物は、外科的に作成した卵巣摘出雌ラットがあるにすぎない。しかしながら、このモデル動物を用いた解析だけでは、種々の病態及び要因を包括している骨粗鬆症に対する薬物の効果を調べるには不十分である。即ち、薬物の効果を正しく調べるためには、複数のタイプの異なるモデル動物を使い分けることが望ましい。

25 骨粗鬆症の成因に大きく関与する骨の再形成（リモデリング）は、破骨細胞による骨の吸収と、それに引き続く骨芽細胞による骨の形成の2つの相に大きく分けることができる。この2つの異なる細胞系列間の機能的共

役関係は、両者の間の緊密な細胞間応答機構により保たれているものと考えられる。

最近の発生工学の発展により、人為的に外来性遺伝子を組み込んだトランスジェニック動物(Transgenic animals)の作成が可能になった(Gordon J. and Ruddle F., Science. 214. 1244~1246. 1981)。卵への外来性遺伝子の導入方法には、外来性遺伝子を微小ピペットに吸入し、これを1細胞期卵の前核内へ注入する顕微注入法(Gordon et al., 1980)、あるいはウイルスを介して感染させる方法があり、外来性遺伝子を組み込んだ卵は形質転換卵とよばれる(Gordon J et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 7380~7384. 1980; Jaenisch R et al., Cell 32. 209~216. 1983)。この形質転換卵を、偽妊娠させた仮親(里親)の生殖器官(卵管または子宮)に移植することにより、成長させることができる。得られた成体のトランスジェニック動物は、外来性遺伝子を自らの染色体に組み込んでおり、且つ適切なプロモーターの影響下、外来性遺伝子を発現することができる。

15 こうして取り込まれた外来性遺伝子は、トランスジーン(Transgene)と呼ばれている。種々のプロモーター領域を選択しトランスジーンと組み合わせることにより、受精卵から成体に至る各ステージに特異的なトランスジーンを発現させることができる。その発現の結果、トランスジーンによりコードされる蛋白質がトランスジェニック動物内で生産される。特にその蛋白質が動物にとって重要な機能を果たす場合は、その個体の発生のある時点で、個体の表現型に何らかの変化を引き起こすこともあり得、ヒトのある遺伝病に類似した形質を引き起こすことも可能である。また、トランスジェニック動物が、トランスジーンを自らの染色体に取り込んでいるかどうかは、PCR法やサザンブロット法等の解析により確かめられる。

20 もし、この取り込みが確認されたら、この動物は、in vivoにおける遺伝子発現解析、例えば、ノーザンブロット法や免疫抗体法等による解析に利用される。

遺伝子の発現を制御するのは、目的蛋白質をコードする遺伝子上流に置かれているプロモーター及びエンハンサーとよばれる遺伝子の特定の領域である。プロモーターは、DNAを鋳型にmRNA合成(転写)を開始するDNA上のシグナルで、特徴的な塩基配列を持っており、RNAポリメ  
5 ラーゼの作用により目的蛋白のmRNA合成が開始される。このプロモーター領域のさらに上流に、エンハンサーと呼ばれるDNAの転写効率を増強させる働きを持つ特殊なDNA塩基配列を組み込んでおくことで目的蛋白の生産効率をより高めることができる。

個体がトランスジーンで形質転換されたという報告、あるいはその結果、  
10 個体の表現型が変わったという報告はこれまでにいくつかなされてお  
り、特にPalmiter R.D. and Brinster R.L. (Annu. Rev. Genet., vol. 20, p. 465~499: 1986) や Gordon J.W. (In. Rev. of Cytobiol., vol. 115, p. 171~229: 1989) 等の総説に詳しく述べられている。これらのトランスジェニック動物は、1) 発生過程での遺伝子発現の個体レベル (in vivo) での解析、2) 遺伝病の克服または軽減に向けた研究等の分野でも利用さ  
15 れ得る。

これまで、骨疾患の分野では、異常コラーゲン遺伝子を過剰発現させたトランスジェニック動物が知られている。骨基質の有機成分は、I型のコラーゲンを主体(約90%)とし、様々の非コラーゲン性蛋白質が残りの  
20 約10%を構成している。このコラーゲンに関して、異常I型コラーゲン遺伝子の過剰発現によるドミナントネガティブノックアウト (dominant negative knockout) により骨形成不全症様の病態を示すトランスジェニックマウスが作製された(Stacey A. et al., Nature, vol. 332, p. 131~136, 1988; Pereira R. et al., J. Clin. Invest., vol. 91, p. 709~716, 1993)。更に、異常II型やX型コラーゲン遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスでも骨の石灰化の遅延を伴う軟骨形成障害が認められてい  
25 る (Vandenberg P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 764

0~7644, 1991; Jaceno O. et al., Nature, vol. 365, p. 56~61, 1993)。  
これらのトランスジェニックマウスに見られる病態の原因として、例えば、  
II型コラーゲンを形成する3本の鎖のうち1本でも短い異常なコラーゲン  
が含まれると、コラーゲン線維の安定性が低下し、軟骨の組織形成が阻害  
5 されることによる等が考えられている。また、これらの病態は、ヒトの脊  
椎骨幹端部の形成障害(spondylometaphyseal dysplasia)や骨端軟骨異形  
成症 (metaphyseal chondrodysplasia) に極めて類似していることが知ら  
れている。しかし、残念ながらこれらトランスジェニックマウスは、出生  
直後に死亡するか、あるいは生殖能が欠けているため、疾患モデルとして  
10 系統を確立し、十分な病態解析を行うことは不可能であった。従って、さ  
らに骨疾患モデルとして適切な系統化ができるトランスジェニック動物の  
作出が強く望まれている。

骨中には、非コラーゲン性タンパク質は約200種類存在していることが  
知られている (Delmas P.D. et al., Calcif. Tissue Int., vol. 36,  
15 p. 308~316, 1984)。特に骨中で含量が多いのは、オステオカルシン、オ  
ステオネクチン及びオステオポンチンであり (Terminé J.D. et al., J.  
Biol. Chem., vol. 256, p. 10403~10408, 1981)、主に骨芽細胞から分泌  
される。

骨非コラーゲン性タンパク質のうちオステオポンチンは骨特有のシアロ  
20 蛋白質 (bone sialoprotein, BSP) として、1986年Oldbergら (Oldberg A.  
et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, p. 8819~8823, 1986)  
により、そのcDNAがクローニングされた。そのcDNAの塩基配列  
から推定されたこのBSPのアミノ酸配列の中には、細胞接着配列である  
A r g - G l y - A s p (R G D) 配列がつけられた。このR G D配列  
25 により骨基質中のミネラルと細胞との橋渡しに関与するという意味で上記  
シアロ蛋白質はオステオポンチンと命名された。

オステオポンチンは、細胞接着、伸展活性のあることから注目されてい

るタンパク質である。Denhardtらは、マウス JB6 epidermal cellline C  
122 を発ガンプロモーターであるTPA (12-O tetradecanoylphorbol-13-  
acetate) で処理することにより誘導された1.6 KbのmRNAのcDNA  
をクローニングし、2 a rと命名した (Smith J.H. et al., J. Cell  
5 Biochem., vol. 34, p. 13~22, 1987) が、このcDNAの塩基配列を調  
べた結果、Oldbergらのオステオポンチンと同じものであることが分かっ  
た。Butlerらもラットの骨から44 kDのリンタンパク質を分離し、その  
生化学的性質を詳しく調べた結果、オステオポンチンと同じタンパク質で  
あることが分かった (Prince C.T. et al., J. Biol. Chem., vol. 262,  
10 p. 2900~2907, 1987)。従って、オステオポンチンは骨特有のシアロ蛋白  
質 I (bone sialoprotein I)、44 kDリン蛋白質 (phosphoprotein) 及  
び2 a rと呼ばれているものと同じ蛋白質である。

オステオポンチンは、免疫組織化学的手法により、骨中では、骨前駆細  
胞 (osteoprogenitor cell)、骨芽細胞及び骨細胞 (Mark M.P. et al.,  
15 J. Histochem. Cytochem., vol. 35, p. 707~715, 1987) に、また、骨組  
織以外では、腎臓、ニユーゴン、内耳の感覚及び分泌細胞など (Mark M.P.  
et al., Cell Tissues Res., vol. 251, p. 23~30, 1988) にも存在するこ  
とが報告されている。更に、ノーザンブロット (Northern blot) 法やin  
situハイブリダイゼーション (in situ hybridization) 法により、骨組  
20 織以外に腎臓、胎盤 (Boon K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.,  
vol. 148, p. 1129~1136, 1987; Nomura S. et al., J. Cell Biol., vol.  
106, p. 441~450, 1988) 及び動脈硬化を起こしている血管近傍の平滑筋  
(Ikeda T. et al., J. Clin. Invest., vol. 92, p. 2814~2820, 1993)  
で発現のあることが報告されている。

25 骨及び歯の発生過程におけるオステオポンチンの発現についてはMarkら  
が報告している (Mark M.P. et al., Differentiation, vol. 37, p. 123~  
136, 1988)。即ち、軟骨性化骨の場所では軟骨-骨移行部の軟骨細胞のみ

が、また、骨発生においてはアルカリホスファターゼの出現と殆ど同時に、骨形成細胞で発現を認めている。歯の発生過程においては、オステオポンチンは石灰化の始まる前の象牙芽細胞 (odontoblast) で合成され、歯芽 (predentin) に分泌される。

- 5        しかしながら、以上のような組織化学的な成果にもかかわらず、オステオポンチンの生理学的機能は、今だ全ては明らかになってはいない。だが、いくつかのオステオポンチンの生理機能を示唆している報告がある。

即ち、骨代謝においては、オステオポンチン中に細胞接着配列があることから細胞同志を接着させ、伸展させる活性のあることが確認されており  
10 (Somerman M. J. et al., Matrix, vol. 9, p. 49~54, 1989)、この細胞接着の機構を介して骨の細胞の代謝を調節しているものと考えられてる。骨の細胞の分化過程におけるオステオポンチンの発現が、前骨芽細胞では少なく、基質合成を活発に行う形成期骨芽細胞になると上昇し、石灰化骨組織を形成する幼若骨細胞において最も盛んになり、骨形成を終了した成熟  
15 骨芽細胞では発現が下がること明らかにされており、オステオポンチンが骨の石灰化に重要な機能を有することも示唆されている (Stein G. S. et al., FASEB J., vol. 4, p. 3111~3123, 1990)。また、オステオポンチンが腎尿細管にも発現すること (Nomura S. et al., J. Cell Biol., vol. 06, p. 441~450, 1988)、及び  $1\alpha, 25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$ 、PTH 等によっ  
20 て調節されること (Noda M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, p. 9995~9999, 1990; Noda M. et al., J. Cell Biol., vol. 108, p. 713~718, 1989) などから、これらの細胞による骨の電解質交換においてオステオポンチンが何らかの機能をもつことが推察される。さらに、オステオポンチンが破骨細胞のアンカーとなり得る可能性も報告された  
25 (Reinholt F. P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, p. 4473~4475, 1990) ことを考慮すると、骨扁平細胞 (bone lining cells) や骨細胞によるオステオポンチンの産生が骨のリモデリング、特に破骨細胞



による骨吸収において、破骨細胞の分化、誘導及び機能発現等に重要な役割を持つことが示唆される。軟骨組織においては、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞及び肥大軟骨細胞等にオステオポンチンの発現が認められていないことから、軟骨形成にオステオポンチンは関与していないことが考えられる。しかし、石灰化軟骨のうち特に血管侵入部位の近傍の細胞に顕著なオステオポンチンの発現が認められていることから、この部位における軟骨組織のリモデリングにオステオポンチンが関与していることが示唆されている。今後、オステオポンチンの骨組織における役割を明確にするためには、さらに、骨リモデリングの際の局在性の変化や細胞レベルにおける局在性を検討する必要があると思われる。また、骨組織以外に悪性腫瘍の転移や神経系組織の機能発現にある種の重要な役割を果たしているとも考えられている。

#### 発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、より有用な代謝性骨疾患モデルを提供するとともに、オステオポンチンの骨組織における機能を明らかにすることである。より詳しくは、オステオポンチンを動物の個体内で過剰発現させることにより、骨のリモデリングに異常を来した状態のトランスジェニック非ヒト脊椎動物、好ましくは、トランスジェニックマウスを発生工学的、遺伝子工学的手法を用いて作成することである。

オステオポンチンをコードする遺伝子断片を非ヒト脊椎動物、好ましくは、マウスの1細胞期胚の前核に顕微注入し、次いでこの注入された胚を、偽妊娠メスに移植し、該マウスを飼育するとトランスジェニック動物が産れる。このトランスジェニック動物は、骨のリモデリングに関与するとされるオステオポンチンを過剰発現すると考えられる。注入された遺伝子断片には、トランスジェニック動物内で非特異的に様々なタイプの細胞でオステオポンチンを発現せしめるようなプロモーターが含まれている。このプロモーターの制御下でオステオポンチンを骨芽細胞あるいは破骨細胞で

過剰発現させることにより、これらの細胞の活性自体を変化せしめるとともに、結果として、骨のリモデリングに破綻を来すことが考えられる。そのように、本発明のトランスジェニック動物は、骨のリモデリングにおけるオステオポンチンの役割を解明できるばかりではなく、骨疾患の有用なモデルになり得る。

本発明は、サイトメガロウイルスエンハンサーのDNA配列及びニワトリリベーターアクチンプロモーターのDNA配列の下流に、オステオポンチン遺伝子をコードするDNA配列を含む外来性遺伝子が組み込まれた骨減少症モデルトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。本発明の重要な点は、オステオポンチンを強力なプロモーターの制御下、骨組織を含むどのタイプの組織でも過剰発現させることができることである。即ち、オステオポンチンの生体内での機能は、骨組織以外にも広範囲にわたっており、これらの組織における作用機序はほとんど不明である。従って、骨組織に止まらず、広く各組織へのオステオポンチンの作用を解明できる可能性がある。そのために限定なく全ての体細胞において転写を開始させるニワトリリベーターアクチンプロモーターおよび転写効率を強力に増強する働きを有するサイトメガロウイルスエンハンサーが組み換え遺伝子に組み込まれた。

本発明は、オステオポンチン遺伝子がマウス由来であることを特徴とする骨減少症モデルトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。

本発明は、非ヒト脊椎動物がマウスであることを特徴とする骨減少症モデルトランスジェニック動物に関する。

さらに、本発明は骨組織において海綿骨梁及び皮質骨の減少、骨端軟骨板直下の軟骨細胞柱の不規則な配列を呈することを特徴とする骨減少症モデルトランスジェニック動物に関する。本トランスジェニック動物は、オステオポンチンの過剰発現により骨減少症様病態を示すことが明らかになっており、従って本発明は骨のリモデリングの破綻の機序等を *in vivo*

で研究するための有用な系を提供するものである。さらに骨疾患の治療薬の探索にも利用できるものである。例えば、検定されるべき薬剤は、対照動物、即ち本発明のトランスジェニックマウスでない動物群（非トランスジェニックマウス等）及び本発明のトランスジェニックマウスに同時に投与される。この薬剤は、トランスジェニックマウスの病態が改善され得るに十分な期間を越えて連続的に投与されるであろう。この十分な期間を経て薬剤を投与された後、トランスジェニックマウス及び対照の非トランスジェニックマウスは、骨組織の解析に供されることとなる。そして、上記パラメーターを比較することにより、薬剤の効能についてひとつの決定を下すことができる。

即ち、本発明の目的は、オステオポンチンを骨組織及び他の組織で強力に発現せしめるために必要なDNA配列、所謂、組み換えDNAを有するトランスジェニック動物を提供することである。さらに、本発明の有用性としては、このトランスジェニック動物がオステオポンチンの *in vivo* における作用解明、骨減少症の発症機序の解明及び骨疾患治療薬の *in vivo* スクリーニングのために用いることができることである。

本発明のトランスジェニック動物がオステオポンチンを大量に合成することによって、骨組織における海綿骨梁及び皮質骨の減少等を生ぜしめ、所謂、低回転型の骨減少症を発症するため、この発症要因としてのオステオポンチンの骨組織における作用機序を解明することができる。これらの作用機序を解明することにより、ヒト骨減少症との共通性を明らかにすることができる。

本発明のトランスジェニック動物は通常の動物と同様に飼育することができ、この系統を維持するための特別な飼育および餌は必要としない。

## 25 図面の簡単な説明

図1は、サイトメガロウイルスエンハンサーのDNA配列及びニワトリベクターアクチンプロモーターのDNA配列の下流に、オステオポンチ

ン遺伝子をコードするDNA配列さらにウサギベターグロビン遺伝子を有するプラスミドp $\beta$ A/OPN-1のプラスミドマップを表した図である。

図2は、トランスジェニックF2マウス( $\beta$ AOPN-202)の腰椎  
5 (A)および非トランスジェニックマウスの腰椎(B)における病理組織の顕微鏡写真である。

図3は、トランスジェニックマウス( $\beta$ AOPN-202)の大腿骨  
(A)および、非トランスジェニックマウスの大腿骨(B)における in situ  
ハイブリダイゼーションの顕微鏡写真である。

10 図4は、トランスジェニックマウス( $\beta$ AOPN-202)および非トランスジェニックマウスの全身の形態写真(A)並びに上記トランスジェニックマウスの全身の形態写真(B)である。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

15 以下の実施例は、遺伝子断片、組換え遺伝子構築体、トランスジェニックマウス等をどのように作成するか等を完全に開示し、記載することを目的としたものであり、本発明はこの実施例によって限定されるものではない。

実施例1 プラスミドp $\beta$ A/OPNの構築

20 マウスで発現させるべき目的遺伝子は以下のように作成した。

はじめに、上記標的遺伝子を発現させるためのベクターを作成した。ニワトリベターアクチンプロモーターとその上流にサイトメガロウイルスエンハンサーを有する哺乳動物発現ベクター pCAGGS (Niwa H. et al., Gene. vol.108, p.193~200, 1991) より2.3 kb断片を Sal I/Pst I  
25 I消化により切り出し、これをクローニングベクター pBluescript (Stratagene社より購入) の Sal I/Pst I 部位へ挿入し、pBsCAG-2ベクターを構築した。サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベター

- ーアクチンプロモーターは、哺乳動物の多種多様な細胞において強い活性が認められており、現在、in vivo における外来性遺伝子発現を強力に促進するプロモーター系として有用であることが判っている。この2.3 kb断片の中には、上記エンハンサー／プロモーターの他に、ウサギベーター
- 5 グロビン遺伝子の一部（第2イントロン、第3エクソン、3'側非翻訳領域から成る）が含まれている。通常、cDNA等の発現させたい目的遺伝子は、ウサギベーターグロビン遺伝子の第3エクソンのEcoRI部位に挿入されることによりその転写効率が改善されることが知られている（Brinster R.L. et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA. vol.35. P.836～
- 10 840）。このpBsCAG-2のEcoRI部位に目的遺伝子であるマウスオステオポンチンのcDNA断片を挿入し、トランスジェニックマウス発現用プラスミドp $\beta$ A/OPN-1を構築した（図1）。マウス1細胞期胚へのDNA導入には、これら組換え遺伝子構築体よりSalI・BamHI消化により遺伝子を単離し、これを用いた。
- 15 また、この構築体には、DNAを消化したり、繋げたり、DNA断片を単離する等の操作が行われたが、このためには Maniatis T. et al（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1982）の標準的DNA組み換え技術が用いられた。また、インサートの結合部周辺のDNA配列は、DNAシーケンシング法により確認された。
- 20 実施例2 外来性遺伝子（ $\beta$ A-OPN）のマウス受精卵への注入及びその受精卵の移植および導入されたトランスジーンの確認
- 実験動物として受精卵採取用にC57BL/6N雄及びB6C3F1雌マウス（C57BL/6N×C3H/HeN）、DNA注入後の受精卵移植用の受容雌（レシピエント）としてICRの雌マウスを用いた。また、
- 25 移植用レシピエントに偽妊娠誘起を施すため、精管を切断したICRの雄マウスとレシピエントを交配させた。まず、過排卵誘起を施すため、B6C3F1雌マウスに妊馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG）及びヒト絨

- 毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を48時間間隔で各々5IU腹腔内に投与後、直ちにC57BL/6N雄マウスと同居させた。翌日、B6C3F1雌マウスの腔に腔栓(プラグ)が形成されているものを交配が成立したマウスと判断した。交配が確認されたマウスを屠殺し、卵管から顆粒層細胞及び卵丘細胞に囲まれた受精卵(前核期卵)を回収した。回収された受精卵は1%ヒアルロニダーゼ(スプレーゼ、持田製薬)を含むM16培養液(Whittingham D. G., J. Reprod. Fert., Suppl. vol. 14, p. 7~21, 1971)中に導入し、顆粒層細胞及び卵丘細胞を除去した後、DNAを注入するまでM16培養液中にて37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%空気の気相下で培養された。培養は、35mm径のサスペンションカルチャーディッシュ(suspension culture dish) (No. 171099, Nunc社)内に滴下した50ml M16培養液の微小滴中に受精卵を浮遊させ、上部を流動パラフィン(white light mineral oil, Fisher社より購入)で覆った状態で行われた。
- 15 外来性遺伝子は、上述の方法で調製したプラスミドp $\beta$ A/OPN-1を宿主大腸菌にて大量増幅の後、抽出された。更に、プラスミドを精製するために、塩化セシウムによる超遠心、臭化エチジウム(ethidium bromide)の除去及び透析処理を行った。精製されたプラスミドは、制限酵素Sal I, Not I及びSca Iにより消化された後、0.8%アгарースゲル電気泳動により、目的の外来性遺伝子( $\beta$ A-OPN, 約3.7kb)が単離された。外来性遺伝子は、注入操作直前にリン酸緩衝液(pH 7.2)にて希釈したものを用いた。この外来性遺伝子は、既報(Hogan B. et al., In Manipulating the Mouse Embryo., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986)に準じて、受精卵に注入された。即ち、培養液中で受精卵を保持用ガラスピペットで保持した後、微細な注入用ガラスピペットを用いてDNA溶液を約2pl(2,000コピー)ずつ受精卵の雄性前核内に注入した。

注入操作後、受精卵は、精管を切断された成熟 I C R 雄マウスと交配した偽妊娠 1 日目の成熟 I C R 雌マウスの卵管内へ移植した。卵管移植後、分娩満期まで飼育し、産仔を得た。分娩後、得られた産仔は、生後 4 週齢で離乳させ、このマウスの尾部の先端部分約 1 cm を麻酔下で切断するとともに耳にパンチングし、個体識別した。尾部の組織より DNA を抽出、精製した後、サザンブロット法によって導入した遺伝子断片がマウスの染色体に組み込まれていることを確認した。即ち、制限酵素 E c o R I、B a m H I で完全に消化させた 10 ag の DNA を 0.8 % アガロースゲル電気泳動し、ナイコンフィルター (GeneScreen Plus, NEN, U. S. A. ) に DNA を転写した。フィルターは、風乾後、ハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーションは、常法 (Maniatis T. et al., 1982) に従って O P N 遺伝子断片をプローブとし、導入遺伝子断片のマウス染色体への組み込みを確認した。

これらの結果を、下記の表 1 に示した。計 3 回の実験で、217 個の受精卵に遺伝子注入操作を行い 178 個 (82%) の受精卵が操作後生存していた。この生存卵すべてを 7 匹のレシピエントに移植した結果、すべてのレシピエントが妊娠し、妊娠 19 日目に帝王切開術を実施することにより 34 匹 (19%) の産仔を摘出した。摘出された産仔は、蘇生後、予め準備しておいた当日出産した里親 (I C R 雌マウス) に保育させた。これらの産仔の内、16 匹 (7.4%) において、羊水より抽出された染色体 DNA に導入遺伝子を確認されたが、この内 1 匹は里親に食殺されたため、その後の解析はできなかった。

表 1

実験回数	注入卵数 : A	移植卵数 : B (注入成功率 : B/A)	生存産仔数 : C (生存率 : C/B)	遺伝子導入マウス : D (遺伝子導入率 : D/A)
25	3	217 178 (82.0%)	34 (19.1%)	16 (7.4%)

食殺されずに生存した15匹のトランスジェニックマウスは、すべて順調に発育し離乳した。これら15匹のトランスジェニックマウスより各々F1マウスを得、トランスジーンの伝達性を調べたところ、1匹のトランスジェニックマウス(βAOPN-305)を除いて、すべてトランスジーンをF1マウスに伝達した。得られたトランスジェニックマウスの性状を、下記の表2に示した。

表 2

	ライン番号	コピー数	性別	F1への伝達	骨での発現	所 見
10	βAOPN-202	1~2	雄	+	+++	F1: 小型
	βAOPN-203	2~3	雄	+	+++	F1: 小型
	βAOPN-303	1	雌	+	+	正常
	βAOPN-304	1	雌	+	+	正常
	βAOPN-305	1	雌	-	-	正常
15	βAOPN-307	10	雌	+	+	正常
	βAOPN-402	10	雌	+	+	F1: 小型
	βAOPN-501	3	雄	+	+	突然死多発
	βAOPN-502	1	雄	+	-	正常
	βAOPN-504	1	雌	+	-	正常
20	βAOPN-601	2~3	雄	+	+++	F1: 小型
	βAOPN-602	1	雄	+	-	正常
	βAOPN-603	1	雌	+	+	正常
	βAOPN-604	1	雌	+	+	正常
	βAOPN-701	2	雄	+	+++	F1: 小型

各トランスジェニックマウスにおけるトランスジーンのコピー数は、ライン間で異なっており、コピー数と発現の程度には関連性が認められなかった。ここでいうコピー数とはトランスジーン1分子を1コピー単位とする。コピー数が複数あるものはトランスジーンが2分子以上連続した形で



連がった状態でホストの染色体上に組み込まれている。得られたトランス  
ジェニックマウスのうち、骨での発現が強い4つのライン ( $\beta$ AOPN-  
202, -203, -601, -701) の尾部組織にトランスジーンが  
存在することをサザンブロッティングにより確認した。トランスジェニッ  
5 クマウスにおいては、トランスジーン由来mRNAの証拠である約1.4  
Kbpの位置にバンドが認められた。

$\beta$ AOPN-202初代トランスジェニックマウスは、外見上正常様  
であったが、突然死亡したため解析が不可能であった。しかし、F1マウ  
スでは、生後3週齢頃より発育遅延が観察され、それ以降、漸次その傾  
10 向が顕著になった。これらのマウスは、すべてトランスジェニックであっ  
た。

### 実施例3 トランスジーン由来のmRNA発現

トランスジーン由来のmRNA発現は、 $\beta$ AOPN-トランスジェニッ  
ク14ライン、すべてのF1マウスにおいて、ノーザンブロット解析及び  
15 RT-PCR法により確認した。トランスジェニックF1マウス及び同腹  
の非トランスジェニックF1マウスの脳、肺、腎臓、脾臓、小腸、骨格筋  
及び頭蓋冠より、全RNAを単離した。ノーザンブロット解析には、20  
mgの全RNAを1.1%アガロース/1.1Mホルムアルデヒドゲル電気泳  
動し、次いで、これをナイオン膜フィルターに移した。プレハイブリダ  
20 イゼーションは、ハイブリダイゼーション液〔5×SSC (1×SSC =  
0.15M NaCl, 15mM Na-citrate, pH7.4)、50%ホルムアミド、  
5mMEDTA、5mg/mlの変性サケDNA、5×Denhardt試薬等  
を含む〕の中で、42℃にて2時間行った。次いで、ランダムにプライミ  
ングしたcDNAプローブ (オステオポンチン遺伝子断片) を熱変性させ  
25 た後、これをハイブリダイゼーション液に加え、ハイブリダイゼーション  
を行った。反応は、42℃にて18時間行い、洗浄は、0.1×SSC/  
0.1%SDS中、56℃、20分間行った。フィルターは、-80℃に

て24～72時間暴露した（増感スクリーン+コダックXAR-5フィルム使用）。14ラインのF1トランスジェニックの上記の主要臓器について、ノーザンブロット解析を実施したところ、比較的種々の臓器で高い発現を示すライン（ $\beta$ AOPN-202, 203, 601, 701）及び低い発現を示すかあるいは、まったく発現していないライン（ $\beta$ AOPN-303, 304, 307, 402, 501, 502, 504, 602, 603, 604）に分別することができた。これらの高発現ラインは、解析した臓器のうち腎臓、小腸、骨格筋及び頭蓋冠において高い発現が認められた。そこで、これらトランスジェニックマウスの内、オステオポンチンmRNAの発現レベルが高く、且つその子孫に表現型の変化が認められたラインを選択し、これらの選択されたライン（ $\beta$ AOPN-202）について詳細な病態解析を行った。なお、非トランスジェニックマウスは、トランスジェン由来mRNAの発現は全く認められなかった。

#### 実施例4 トランスジェニックマウスの骨組織における病理学的解析

本解析は、トランスジェニックF1及びF2マウス（ $\beta$ AOPN-202）について実施した。

動物をペントバルビタール酸ナトリウムにて深麻酔することにより屠殺した後、上記の主要臓器に加えて、大腿骨及び腰椎を各々摘出した。これらの組織を10%ホルマリン緩衝液にて固定した後、パラフィンに包埋し、約2mmの連続薄切標本を作製した。なお、骨組織については、薄切標本作製する前に、14%EDTAに約1週間浸漬することにより脱灰処置を施した。これらの標本について、ヘマトキシリン-エオシン染色を行うと共に、骨標本については、酒石酸耐性酸ホスファターゼ（TRAP）染色を常法に従って行った。染色後の標本は、光学顕微鏡下にて異常の有無を観察した。

トランスジェニックF2マウス（ $\beta$ AOPN-202）の腰椎における病理組織像の写真を図2に示す。 $\beta$ AOPN-202の腰椎（図2A）で

は、非トランスジェニックマウスの腰椎（図2B）と比べ、軟骨でできた成長板直下の石灰化軟骨及び一次海綿骨梁の形成が乏しいことが観察された。また、 $\beta$  A O P N - 2 0 2 の大腿骨における病理学的所見も腰椎と同様であった。更に、 $\beta$  A O P N - 2 0 2 の大腿骨について、T R A P 染色を施したところ、非トランスジェニックマウスと比べ、骨梁が乏しいこと以外に、赤く染まったT R A P 陽性細胞が少ないことが観察された。このことは、T R A P 陽性細胞、即ち破骨細胞の活性が低下していることを示している。従って、この病態は、骨量の減少が骨吸収の亢進によるものではなく、骨形成の不全によるものであることが考えられ、骨芽細胞自体の活性も低下していることが示唆された。なお、骨組織以外の臓器の病理像は、何ら異常を認めなかった。

実施例5 in situ ハイブリダイゼーション法によるトランスジェニックマウスの骨組織におけるオステオポンチンmRNAの検出

トランスジェニックマウスの骨組織中で過剰発現したオステオポンチンmRNAの発現状態を調べるため、in situ ハイブリダイゼーション法による検出を試みた。なお、本解析には、トランスジェニックF1及びF2マウス（ $\beta$  A O P N - 2 0 2 ）について実施した。

生後29週令の $\beta$  A O P N - 2 0 2 の大腿骨を採取し、パラホルムアルデヒドから調製した4%リン酸緩衝ホルマリンで一日浸漬し、固定した。なお、これらのマウスは、浸漬固定前に上記の固定液にて予め環流固定を行った。固定した大腿骨は、70%、80%、90%、95%及び100%のエタノール中で脱水、キシレン中で透徹後、非脱灰状態のままメタクリレート系樹脂に包埋した。包埋した組織から、硬組織用ミクロトーム（Reichert-Jung社製）を用いて厚さ3 $\mu$ mの非脱灰骨組織切片を作製した。

マウスオステオポンチンのcDNAからSP6及びT7RNAポリメラーゼを用いて、 $[^{35}\text{S}]$  UTPで標識したアンチセンスRNAを合成して

プローブとして用いた。次いで、上記の非脱灰骨組織切片上で、プローブを既報 (Nomura S. et al., J. Cell Biol., vol. 106, p. 441~450, 1988) に従ってハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、コダック NTB-3 乳剤をコーティングして 4℃ で 2~3 週間露光した。露光した標本は現像処理後、明視野及び暗視野顕微鏡で銀粒子の出現を観察した。

$\beta$  A O P N-202 の大腿骨における *in situ* ハイブリダイゼーションの結果の顕微鏡写真を図 3 に示す。 $\beta$  A O P N-202 の骨でのオステオポンチンの発現は、トランスジェニックマウスの方がかえって少なく、(図 3 A) 骨髄を含めた軟組織での発現も非トランスジェニックマウスの方が多くいことがわかった (図 3 B)。骨組織の変化は  $\beta$  A O P N-202 において骨梁の長さは十分にあるものの、数と太さが減少していることが観察された。これは、骨形成が阻害された場合に認められる所見であると考えられる。これらのことから  $\beta$  A O P N-202 では骨梁の減少に伴ってオステオポンチンの発現が少なくなることが示唆された。

トランスジェニックマウスの全身の形態写真を図 4 に示す。図 4 A は、 $\beta$  A O P N-202 F2 マウス (写真左端) 及び非トランスジェニックマウス (写真右端) の全身の形態写真であり、図 4 B はトランスジェニックマウスの全身の形態写真である。トランスジェニックマウスは、非トランスジェニックマウスと比べ、小さく、体重は非トランスジェニックマウスの約半分である。

本発明のトランスジェニック動物は、オステオポンチンの骨中での過剰発現により骨芽細胞及び破骨細胞の活性を低下せしめた結果、骨量の減少を生じるものである。その病態は、ヒトにおける低回転型の骨粗鬆症にきわめて類似しており、有用なモデルになり得る。従って、本トランスジェニック動物は、骨芽細胞の活性化及び破骨細胞の分化誘導、活性をさらに抑制させる能力に関する薬剤の効果検定に利用できる。例えば、検定され

るべき薬剤は、対照動物、即ち本発明のトランスジェニック動物でない動物群（非トランスジェニック動物等）及び本発明のトランスジェニック動物に同時に投与される。この薬剤は、本トランスジェニック動物の病態が改善され得るに十分な期間を越えて連続的に投与されるであろう。この充分な期間を経て薬剤を投与された後、トランスジェニック動物及び対照の非トランスジェニック動物は、骨組織の解析に供されることとなる。そして、上記パラメーターを比較することにより、薬剤の効能についてひとつの決定を下すことができる。更に、このような骨疾患を呈する動物を用いて、骨形成と骨吸収との共役機構を解明することは、骨粗鬆症の発現機序の解明のみならず、その根本的な治療法あるいは予防法の確立の上でもきわめて重要である。

15

20

25

## 請 求 の 範 囲

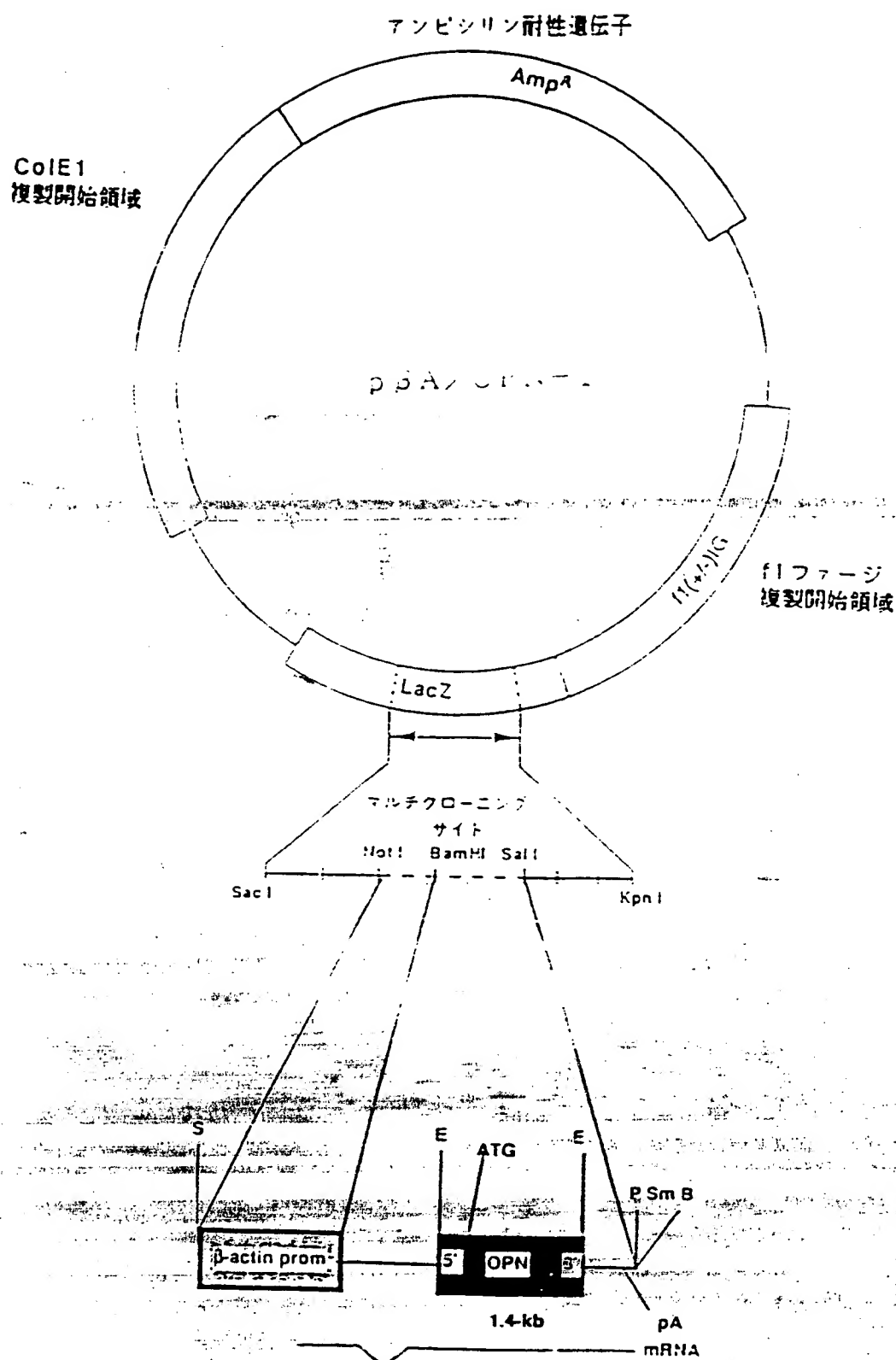
1. サイトメガロウイルスエンハンサーのDNA配列及びニワトリベーターアクチンプロモーターのDNA配列の下流に、オステオポンチン遺伝子をコードするDNA配列を含む外来性遺伝子が組み込まれた骨減少症モデルトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
- 5
2. オステオポンチン遺伝子がマウス由来であることを特徴とする、請求項1に記載の骨減少症モデルトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
3. 非ヒト脊椎動物がマウスであることを特徴とする、請求項1または2に記載の骨減少症モデルトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
- 10
4. 骨組織において海綿骨梁及び皮質骨の減少、骨端軟骨板直下の軟骨細胞柱の不規則な配列を呈することを特徴とする、請求項1ないし3のいずれかの項に記載の骨減少症モデルトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

15

20

25

## 第 1 図



B=BamHI ; E=EcoRI ; P=Pst I ;  
S=Sal I ; Sm=Sma I ; pA=poly(A)

第 2 図

A



B



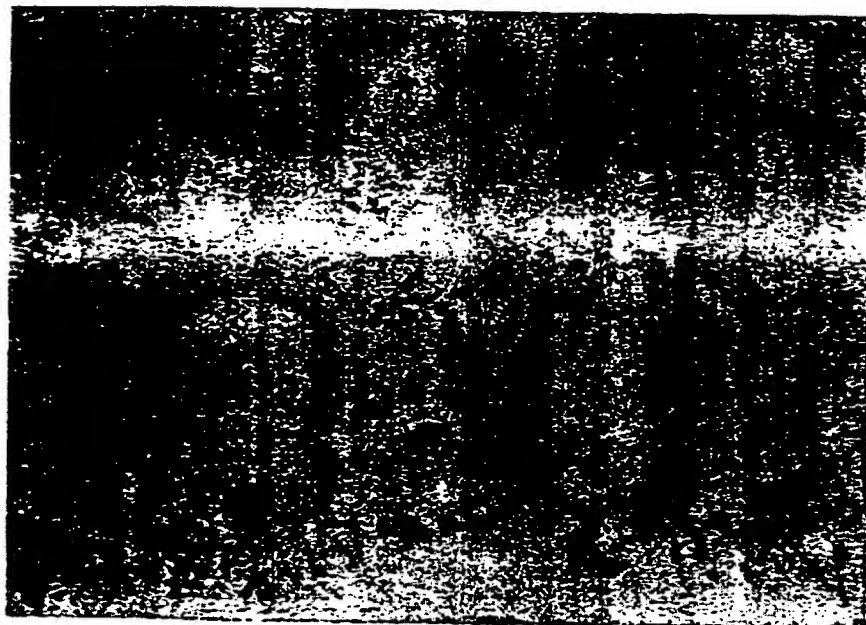


第 3 図

A



B



第 4 図

A



B



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01978

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cell Technology Vol. 13, No. 12 (1994), p. 1072-1081, Seichi Hirota "Relation between physiological calcification and non-physiological calcification as viewed from the gene expression mode"	1 - 4
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87 (1990), p. 4473-4475, Finn P. Reinhold "Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone"	1 - 4
A	FASEB J. Vol. 4, p. 3111-3123, (1990) Gary S. Stein "Relationship of cell growth of the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation"	1 - 4
A	J. Clin. Invest. Vol. 95 (1995) p. 1446-1456, Michael S. Marber "Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury"	1 - 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 August 26, 1996 (26. 08. 96)

Date of mailing of the international search report  
 September 3, 1996 (03. 09. 96)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01978

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 206, No. 1 (1995) p. 287-293, Hiroaki Honda "Increased tyrosine-phosphorylation of 55kDa proteins in beta-actin/tec transgenic mice"	1 - 4
A	GENE No1. 108 (1991) p. 193-199, Eitoshi Niwa, "Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector"	1 - 4

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A01K 67/027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	細胞工学 Vol.13 No.12 (1994) p.1072-1081. 實田誠一 「遺伝子発現様式からみた生理的石灰化と非生理的石灰化の関連性」	1-4
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.87 (1990) p.4473-4475. Finn P. Reinhold: "Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone"	1-4
A	FASEB J. Vol.4 p.3111-3123. (1990) Gary S.Stein "Relationship of cell growth of the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation"	1-4
A	J.Clin.Invest. Vol.95 (1995) p.1446-1456. Michael S.Warber "Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse"	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.08.96

国際調査報告の発送日

03.09.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	increases the resistance of the heat to ischemic injury] Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 206 No. 1 (1995) p. 287-293, Hiroaki Honda 「Increased tyrosine-phosphorylation of 55kDa proteins in beta-actin/tec transgenic mice」	1-4
A	GENE Vol. 108 (1991) p. 193-199, Hitoshi Niwa 「Efficient selection for high- expression transfectants with a novel eukaryotic vector」	1-4